M. Prof. Foà
Omaggio
dell'A.

Istituto patologico degl' Incurabili

Sulla evoluzione delle funzioni embrionali

A 248

RICERCHE SPERIMENTALI

DELLA

Sig.ª Dott. SOFIA BAKUNIN

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno XLVIII, Nuova Serie, N. 3.

NAPOLI
STABIL. TIPOGRAFICO CAV. A. TOCCO
S. Pietro a Majella, 31
1894.

Istituto patologico degl' Incurabili

Sulla evoluzione delle funzioni embrionali

RICERCHE SPERIMENTALI

DELLA

Sig.ª Dott. SOFIA BAKUNIN

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno XLVIII, Nuova Serie, N. 3.

NAPOLI
STABIL. TIPOGRAFICO CAV. A. TOCCO
S. Pietro a Majella, 31
1894.

Il tema propostomi è lo studio comparativo delle funzioni embrionali per la serie di stati evolutivi che l'embrione attraversa prima di completare il proprio sviluppo. In ciò fare mi sono anche studiata di dimostrare quanta analogia esista tra l' attività e la qualità delle funzioni embrionali di un animale superiore e l'attività e la qualità delle funzioni, che presentano gli organismi più umili nel loro stato adulto.

Non ho bisogno di dichiarare che un tema così complesso è di quelli che richiedono molta ricchezza di materiale scientifico, lunga preparazione e sopratutto parecchi anni di assiduo lavoro. Ciò per altro non vuol dire che nell'intraprenderlo a trattare, non si possa, secondo meglio se ne offre l'occasione, volgere le ricerche sopra singoli argomenti speciali della vita embrionale, tentando in siffatto modo di prepararsi a consolidare il materiale primo, che dovrà servire di fondamento all'edifizio completo. Ed ora appunto soltanto alcuni di questi argomenti speciali formano l'obbietto della presente dissertazione.

Giova però all'esposizione degli esperimenti finora eseguiti far precedere alcune considerazioni di ordine generale, le quali varranno da una parte a mettere in maggior rilievo l'importanza dell' argomento e dall' altra a lumeggiare le ricerche intraprese e che andrò brevemente esponendo.

Considerazioni generali

Le trasformazioni di un organismo sono segnalate da cangiamento di forma ed ancor più dal mutamento delle funzioni. Perchè se la forma caratterizza l' organismo vivente, nelle funzioni sta la vita istessa, espressione ultima delle proprietà fisico-chimiche del protoplasma e della sua reazione verso gli agenti dell'ambiente esterno.

Non è a porre in dubbio che nell'evoluzione di un essere non muti soltanto l'aspetto delle cellule e la disposizione dei tessuti, ma la composizione stessa del protoplasma cellulare, e poichè le funzioni sono appunto espressione delle proprietà fisico-chimiche del

protoplasma, la fisiologia embrionale è indispensabile all'intelligenza del processo evolutivo.

Così come v' ha un' embriogenesi degli organi, deve esservi un' embriogenesi delle funzioni.

Morfologicamente considerato, l' embrione è prima cellula, poi cumulo indifferenziato di cellule, poi semplice vescicola le cui pareti risultano da più foglietti. Da questo stadio di somma semplicità per introflessione, estroflessione ed ispessimento dei foglietti e per differenziazione istologica degli elementi, l'embrione raggiunge la complessità di un organismo adulto. Funzionalmente considerata, questa trasformazione non è meno maravigliosa. L'ovulo che è una cellula annessa all'organismo materno, la quale respira e si nutre come le altre ed è incapace di più elevate manifestazioni vitali, ascende alla dignità di un organismo, che si muove, che sente, che pensa.

Si conoscono relativamente bene le trasformazioni morfologiche attraverso le quali dall' uovo si forma l' organismo adulto, ma è ancora assai poco noto come sorgano nell' organismo le funzioni e come si svolgano, mutando nei caratteri di necessità vitale, di intensità e di continuità e nel meccanismo funzionale con cui si eseguono.

Eppure, geneticamente considerato, questo studio precede l'altro, perchè la funzione precede l'organo destinato a compierla e spesso accade che essa muti tuttochè la forma degli elementi cellulari funzionanti non sia ancora mutata. Ne è esempio il cuore embrionale nel quale la contrazione appare assai prima che le cellule abbiano assunto l' aspetto di fibre muscolari. Lo studio delle funzioni può dunque farci apprezzare delle trasformazioni, che dalla forma non argomenteremmo e in tutti i casi ha il vantaggio di segnalare le condizioni fisico - chimiche in atto del protoplasma, dove che la morfologia spesso sta a documentare influenze ataviche remote.

Per tutte queste ragioni, per bene intendere l'organismo embrionale in ogni sua fase evolutiva, occorre stabilire di rincontro alla serie di trasformazioni morfologiche descritte durante l' evoluzione dell'uovo, una successione di stati funzionali progressivamente perfezionantisi come l' organismo in cui si manifestano.

Questa corrispondenza tra la forma assunta dall'embrione nello sviluppo e lo stato delle sue funzioni, ci permetterà di giungere ad altre deduzioni.

Dacchè Haeckel, pel primo, intravide nello sviluppo individuale o ontogenetico un'evoluzione filogenetica o in altri termini un'evoluzione della serie animale, si sono andate considerando e rilevando le somiglianze morfologiche che esistono tra l'organismo adulto degli animali inferiori e gli stati embriologici che attraversa l'animale superiore prima di completare il proprio sviluppo. Si è così visto che certi momenti poco avanzati di sviluppo di un animale superiore, corrispondano spesso morfologicamente a periodi già inoltrati di organismi più umili. L' embrione dei mammiferi ad es. percorre fasi di sviluppo che corrispondono successivamente alle forme definitive del pesce, dell'anfibio e dell' uccello. Esso presenta transitoriamente il cuore semplice, le fessure branchiali, il rudimento cerebrale non sviluppato, la corda dorsale cartilaginea che sono proprie dei vertebrati infimi per tutta la vita.

Ora considerando che la morfologia è subordinata alle condizioni di funzionamento del protoplasma, non è a porre in dubbio che all' analogia morfologica si accompagni o preceda l' analogia funzionale.

Certo nella serie degli animali inferiori, alla semplicità e diversità dell'organizzazione si accompagnano la semplicità e diversità delle funzioni, così dunque negli stadii embrionali degli organismi superiori, alla semplicità morfologica che li avvicina agli animali inferiori, s'accompagna la diversità funzionale che conferma l'analogia. L' embrione dei mammiferi che in una sua fase evolutiva si assomiglia morfologicamente ad un pesce o ad un anfibio, presenterà nelle sue funzioni (termogenesi, respirazione ecc.) le particolarità che distinguono questi vertebrati inferiori.

Non è però che io voglia riguardare gli organi rudimentali che accennano ad influenze ereditarie come organi funzionanti, nè che io argomenti da queste note morfologiche le speciali qualità delle funzioni. Io non voglio dimostrare ad esempio che l'embrione negli stadii evolutivi che attraversa, rassomigliandosi per le sue branchie rudimentali ai pesci, debba come i pesci respirare colle branchie, non questo, ma a loro somiglianza esso presenterà bisogni respiratorii assai minori, per la cui alimentazione basta la piccola quota di O contenuta nell'acqua e la cui provvigione può farsi per mezzo di un altro organo invece delle branchie. Intendo cioè dire che nello

studio comparato delle funzioni la somiglianza riguardi prima di tutto la funzione cellulare per sè stessa nei suoi caratteri d'intensità, di necessità vitale e di continuità e poi gli organi ausiliarii che fanno da intermediarii tra la cellula e l'ambiente e che attuano nel mezzo interno, circostante alla cellula, le condizioni necessarie per la sua funzione.

Soltanto quando lo stadio evolutivo si prolunghi per un tempo piuttosto lungo in un ambiente adeguato tanto che si modifichi il meccanismo funzionale, può la somiglianza completarsi e lo stato embrionale rispondere in tutto al tipo che riproduce di un organismo inferiore.

Le metamorfosi degli insetti e dei batraci ci offrono esempi assai significativi di mutamento nell' intensità delle funzioni ed insieme nella forma e nella struttura degli organi destinati a compierle.

La rana che è un batracio superiore, presenta per un periodo assai breve della sua vita larvale, le branchie esterne, che nel tritone persistono per un tempo più lungo e nel proteo e nella sirena permangono per tutta la vita.

Molti insetti che allo stato larvale sono acquatici, forniti di branchie, adulti vivono nell' aria.

Però negl' embrioni che non mutano il mezzo ambiente e che fin dai primordii della loro evoluzione si trovano, come l'embrione degli uccelli, in un mezzo respirabile e nutritivo che sarà quello dell' uccello adulto, l' intensità e la necessità vitale d'una funzione possono rendere adatto l' embrione a vivere in condizioni esterne analoghe a quelle tollerate dagli animali inferiori, ma per le condizioni dell'embrione, questa tolleranza rimane potenziale e superflua. Per rilevarla occorrerà modificare artificialmente le condizioni di vita dell' embrione, ponendole in quelle richieste dagli animali inferiori o tollerate dagli stessi.

Quando un embrione, ad esempio, in un suo stadio evolutivo tolleri un ambiente asfittico, così come lo tollerano gli animali a sangue freddo dotati di debole potere respiratorio, vorrà dire che la funzione respiratoria negli embrioni come negli animali a sangue freddo, presenta uguale intensità. Poco importa se negli uni l'introduzione di O si compia per mezzo delle branchie o della cute, e negli altri funzioni per questo scopo l' aia vascolosa.

Noi ci proponiamo dunque di studiare la funzione per sè stessa,

prescindendo nella maggior parte dei casi, dai suoi meccanismi esecutivi e dalle note morfologiche che accennano ad altri meccanismi adoperati dagli umili antenati dell' animale.

Ora per dimostrare l' analogia funzionale tra gli stati embrionali degli animali superiori e gli stati adulti degli esseri inferiori, e per stabilire le serie di trasformazioni che la funzione subisce durante l' evoluzione dell' uovo, occorre studiare in ciascun periodo evolutivo dell'embrione lo stato delle sue funzioni e di ciascuna di esse ricercare:

1.° Se esiste nell' organismo embrionale ed in quale momento dello sviluppo.

2.° Che importanza vitale abbia assunto e se sieno compatibili colla vita, le condizioni esterne che impediscono temporaneamente la funzione.

3.° Se questa si compie in un modo continuo od interrotto.

4.° Se sia debole od intensa e quanto.

5.° Se si compie diffusamente in tutte le parti dell' organismo, o pel suo meccanismo di esecuzione occorrono organi speciali.

6.° A quale stato morfologico delle cellule funzionanti si accompagni.

7.° Che modificazioni determini nei prodotti anaplastici (progressivi) e cataplastici (regressivi) dell' organismo.

Ricercando di ogni funzione in ogni periodo evolutivo tutte queste particolarità, occorre paragonare le modalità transitorie che presentano, a quelle permanenti degli animali inferiori e stabilire un parallelo tra la fisiologia comparata e la fisiologia embrionale.

È questo il piano di ricerca. La sua esecuzione, come ho detto, non è stata da me compiuta, ma soltanto parzialmente espletata.

Oggetto di ricerca possono essere gli embrioni che si sviluppano fuori dell' organismo materno. Epperò sono utili tutte le uova e sommamente opportune quelle di uccello; è raccomandabile anche lo esame delle funzioni in quegli organismi che fuori dell' uovo attraversano nuovi stati evolutivi (es. la rana che è prima girino, esempio il bruco che si fa farfalla).

La facilità di procurarsi delle uova di pollo, la breve durata della loro evoluzione, la possibilità di determinare lo sviluppo in modo perfettamente normale in una stufa incubatrice e di seguire

in uno stesso uovo lo sviluppo d' un embrione, la certezza nel determinare esattamente l' età, sono tutti vantaggi impareggiabili che mi fecero per ora limitare le mie osservazioni e le mie esperienze all' embrione di pollo, con proposito di estenderle ulteriormente ad altri organismi.

Dei metodi tenuti nella ricerca non farò esposizione riassuntiva perchè svariati e molteplici furono ispirati a volta a volta dalle circostanze e mutarono secondo l' età dell' embrione, la funzione ricercata, il quesito propostomi.

Ne dirò a volta a volta esponendo i risultati delle mie ricerche.

Tenendo conto però che l' animale vive nell' ambiente a spesa dello stesso e subordinatamente alle sue condizioni fisiche, che alla intensità dei processi vitali si proporziona il consumo delle sostanze contenute nell' ambiente, che la sottrazione dello stesso equivale alla fine o alla sospensione della vita, che alla sua modificazione segue la modificazione delle funzioni vitali, s' intende di leggieri che lo studio sperimentale delle funzioni debba compiersi specialmente modificando e variando ad arte gli agenti esterni della funzione, cioè l' ambiente, e studiando quali condizioni materiali esterne sieno indispensabili alla vita.

Passo ora a riferire le mie ricerche intorno alla respirazione embrionale riservandomi, in una prossima comunicazione, il compito di trattare delle altre funzioni (1).

Modalità della respirazione nella serie animale

Noi non possiamo definire l' essenza del fenomeno respiratorio, possiamo soltanto determinare quali condizioni siano necessarie per l' attuazione dello stesso e quali effetti ne seguano.

Il fenomeno intimo ed essenziale della respirazione consiste in un processo chimico, che si compie negli elementi anatomici dei tessuti col concorso dell' O libero e si accompagna a produzione di calore ed a eliminazione di acido carbonico.

---

(1) Le funzioni sulle quali finora ho istituite le mie ricerche sono: la respirazione, la nutrizione, la termagenesi e le secrezioni. Nel presente lavoro esporrò solamente quelle che ho potuto compiere sulla respirazione e sull' attività secretiva degli epitelii Wolffiani.

Il meccanismo funzionale, che comunemente vien detto respirazione, non è che un ausiliario. Perchè infatti negli animali complessi per mole ed organizzazione l' O giunga a contatto di tutti i tessuti, deve il mezzo interno in cui sono immerse le cellule potersi provvedere di O alla superficie del corpo e fissatolo recarlo ai tessuti. Il meccanismo respiratorio è precisamente deputato a questa provvigione e a questo trasporto.

Nella gran serie animale la funzione respiratoria deve essere studiata come fenomeno intimo cellulare e come meccanismo esecutivo e deve specialmente ricercarsi: se la respirazione sia sempre necessaria alla vita, se sia sempre continua o possa interrompersi, se muti per intensità e di quali meccanismi funzionali usufruisca.

Il fenomeno respiratorio è certamente universalmente necessario perchè si ritrova in tutti gli organismi, si avvera in ciascuna cellula, si manifesta fin dall' inizio della vita ed è allo spegnersi della stessa sua ultima manifestazione. Frammenti di tessuti animali escisi e dissanguati serbano per più ore la proprietà di ridurre l' ossiemoglobina e di togliere O all' ambiente eliminando acido carbonico, quando già ogni altra manifestazione vitale tace. Gli organismi più semplici ed elementari hanno bisogno per vivere di trovare nello ambiente dell' O sia libero, sia disciolto, sia labilmente combinato. Soltanto alcuni infimi organismi microbici pur non essendo dispensati dall' O hanno facoltà di torlo all' ambiente circostante disossidando i composti ossigenati che vi si trovano. Ma non è neppur stabilito se questi microorganismi debbano ascriversi al regno animale o vegetale. In tutti i casi, fattane eccezione, per tutti gli altri esseri animali, la necessità della respirazione è generale e costante.

Ciò che muta assai sensibilmente è l' intensità del fenomeno. Alcuni animali hanno infatti bisogno per vivere di un ambiente respirabile il cui contenuto in O eguagli quello dell' aria, altri continuano a vivere in ambienti assai poco ossigenati. Allorchè sono lenti i processi di ossidazione possono gli organismi contentarsi di una quota minima di O quale è quella contenuta nell' acqua che per volume corrisponde ai 9|1000 dell' ambiente liquido. Può anzi la quota di O che viene discioltà nel sangue, soddisfare per parecchio tempo ai bisogni dei tessuti, epperò la provvista di O compiersi negli

organi respiratorii a intervalli piuttosto lunghi. La rana ad esempio, completamente sviluppata e provvista di respirazione polmonare, non ha bisogno di vivere continuamente nell' ambiente aereo e non esce dall' acqua che a lunghi intervalli financo di ore. Quando l' intensità dei processi ossidativi e per essi l' attività vitale si menomasse ancora, l' O circolante nel sangue si adibirebbe in un tempo anche maggiore e la provvista di O negli organi respiratorii potrebbe compiersi ad intervalli sempre più lunghi e potrebbe alla respirazione polmonare, che è fonte di assorbimento rapido e cospicuo di O, sostituirsi la respirazione cutanea per cui mezzo l' O si assorbe con grande lentezza ed in piccola quantità. E ciò che si avvera sotto l' influenza del raffreddamento nella rana, la quale durante l' inverno, senza perdere l' uso dei sensi, rallenta di tanto i suoi scambii vitali che può per mesi interi soggiornare sott' acqua respirando semplicemente colla superficie cutanea. (W. Edwards. *Influence des agents physiques sur la vie*).

Non è meno diversa la tolleranza degli animali alla sospensione dell' assorbimento dell' O.

L' introduzione dell' O può per alcuni organismi essere interrotta per un tempo più o meno lungo mediante il soggiorno dell' animale in un gas indifferente. Gli animali che vi sopravvivono non sospendono i loro processi ossidativi, ma li rallentano e continuano ad alimentarli con quell' O che è tuttora contenuto nel sangue. Così la rana messa sotto una campana piena di azoto, dopo qualche tentativo di fuga assume l' immobilità assoluta col maggiore risparmio possibile di forza e può così vivere due ore continuando ad eliminare acido carbonico (Landois , pag. 241). Così le tinche non muoiono in un gas indifferente che dopo quattro o cinque ore. Negli organismi a potere respiratorio elevato i processi ossidativi si compiono con intensità e rapidità notevole, così che l' O del sangue vien subito completamente utilizzato ed è indispensabile un continuo rinnovarsi della sua provvista negli organi respiratorii. Quando ciò non accade si sospende la vita.

Finalmente riguardo al modo d' introdurre O distinguiamo una respirazione diffusa compiuta direttamente da tutti gli elementi cellulari dell' organismo, una respirazione della superficie con diffusione

dell'O dagli elementi più superficiali ai più profondi e una respirazione con intermedio di un liquido circolante. Nel liquido circolante può l'O essere disciolto o fissato in una combinazione labile. La superficie attraverso alla quale il liquido circolante assorbe O è l'organo respiratorio, tanto più atto all'ufficio quanto più vasto e riccamente irrigato.

L'elemento che contiene il gas respirabile muove verso la superficie respirante come l' aria accede nei polmoni, o la superficie respirante sporge nel mezzo respirabile, come fanno le branchie esterne nell'acqua circostante.

Quando è più complesso il meccanismo della respirazione e vi partecipano in varia guisa molti organi ed apparecchi, l'insufficiente introito dell'O basta per ostacolare il complicato congegno e l' assorbimento dell'O si arresta assai prima che la quantità di O contenuta nell'ambiente sia esaurita; non perchè non abbiano più facoltà i tessuti di fissare l'O residuale, ma perchè l' aerazione dei polmoni non può più compiersi ed il sangue non è più messo a contatto dell'O residuale, nè lo assorbe, nè lo reca ai tessuti.

Quando viceversa l'accesso dell'O si compie per semplice diffusione gassosa ed il meccanismo respiratorio è semplificato nella sua struttura tutto l'O dell'ambiente vien consumato.

Nelle lumache ad es. che utilizzano la totalità dell'O contenuto nell'aria, l'apparecchio respiratorio è rappresentato da una camera d'aria le cui pareti sono difese dal disseccamento ed in cui le branchie invece che da filamenti o laminette sono rappresentate da creste che s'incrociano disegnando un reticolo. L'aria penetra ed esce da questo ricettacolo non per inspirazione ma per semplice diffusione. Anche i batraci hanno facoltà di consumare quasi tutto l'O dello ambiente, perchè pur cessando la respirazione polmonare che si compie per un meccanismo di deglutizione, continua la respirazione cutanea. Un passero invece muore infallantemente in un ambiente che contenga quindici di O su ottantacinque di azoto, senza utilizzare la quota di O disponibile.

Il contegno degli animali in un ambiente di ossido di carbonio ed aria è anche in rapporto colle modalità che può presentare il meccanismo respiratorio. L' ossido di carbonio è un veleno dotato d'un'azione tutta specifica. Innocuo pel protoplasma, uccide sopprimendo la funzione dell'emoglobina ed è letale per quegli organismi,

nei quali la provvista di O si opera per virtù dell' emoglobina e alla intensità dei processi ossidativi non basta l' O disciolto nel sangue. Così dalla rana è tollerato un soggiorno financo di 48 ore in un ambiente di ossido di carbonio ed O a parti uguali, e agli animali invertebrati privi di emoglobina non nuoce affatto respirare una miscela di aria e di OC che ucciderebbe in brevissimo tempo un animale a sangue caldo.

Riassumendo, noi possiamo rilevare molte modalità respiratorie nella serie animale, sia in riguardo al meccanismo funzionale, sia per la funzione cellulare propriamente detta, studiando il modo di comportarsi dei singoli organismi negli ambienti artificiali (H_2O, aria povera di O, gas indifferenti, ossido di carbonio ecc.).

Io mi propongo di studiare la funzione respiratoria nei varii stati evolutivi che attraversa, riscontrando il modo di comportarsi degli embrioni in questi ambienti.

La letteratura di questo capitolo di fisiologia embrionale è abbastanza ricca di ricerche, alle quali però manca lo speciale indirizzo che mi sono proposto: seguire cioè le funzioni nelle loro modalità evolutive.

Fin oggi è dimostrato che dalla 15ª ora d' incubazione in poi l'O (8) (9) allo stato di gas è indispensabile per la vita dell'embrione di pollo: Che limitandone l'accesso si ostacola l'accrescimento dell'embrione più che la differenziazione e si ottengono degli embrioni atrofici: Che però l'inverniciamento del guscio fatto in modo discontinuo (a punti e a tratti) si concilia collo sviluppo dell'uovo anche quando la superficie d' inverniciamento equivale a metà di quella di tutto il guscio (11). Quanto alla valutazione quantitativa del gas circostante all'uovo, si è constatato che l'uovo di uccello, fecondato o non, assorbe O ed elimina acido carbonico. Nella prima metà dell' incubazione lo scambio gassoso è uguale nelle uova fecondate come nelle infeconde, ma dalla fine della 2ª settimana in poi tanto la eliminazione dell'acido carbonico che l'assorbimento dell'O si fanno più cospicui nelle uova contenenti un embrione (2) e (3).

Di altre indagini farò cenno a misura che me ne si presenterà l'occasione. Seguirà inoltre alla fine del lavoro un indice delle opere e memorie consultate.

Modalità della respirazione durante l'evoluzione embrionale

I quesiti che mi sono proposta relativamente alla respirazione embrionale e che ho svolto avvalendomi in parte di esperienze già compiute, ma aggiungendone sempre altre nuove, sono i seguenti:

Se la funzione respiratoria esiste nell'embrione di pollo tal quale come nell'uccello adulto e fin dal principio dell'evoluzione sia condizione essenziale pel mantenimento della vita.

Se in tutti i suoi periodi evolutivi l'embrione respiri con uguale intensità ed esiga sempre per vivere un ambiente la cui percentuale di O è uguale a quella contenuta nell'aria o tolleri ambienti più poveri in O.

Se l' assorbimento dell' O respiratorio da parte dell' embrione debba necessariamente compiersi in un modo continuo o possa senza danno sospendersi per un soggiorno transitorio dell'uovo in un mezzo privo di O.

Per qual modo l' O viene a contatto di tutti gli elementi cellulari che compongono il piccolo organismo e come e quando la emoglobina diventi indispensabile al meccanismo respiratorio.

Se l' intensità della respirazione epperò dei processi ossidativi che l' accompagnano, si accresca in un ambiente di O puro o in un ambiente di Ozono.

*
* *

La necessità dell' O libero per la vita dell' embrione di pollo è indiscutibilmente dimostrata dal 2° giorno di sviluppo in poi, non però per le primissime ore dell' evoluzione. Schwann ha infatti constatato che facendo incubare le uova in un ambiente di H e sospendendo così l' accesso dell'O senza ostacolare l' eliminazione dell'acido carbonio, lo sviluppo procede fino alla 15ª ora. L'O però consumato dall'embrione in questo periodo è tanto poco abbondante che potrebbero tracce minime del gas disciolte nel vitello o nel bianco d'uovo alimentare la vita. E perciò necessario ripetere l'esperienza curando, prima di porre le uova ad incubare, tenerle per 24 ore in una corrente di H che scacci fin l'ultima traccia d'O disciolto nell'albume o nel vitello.

Io non ho potuto ottemperare a tutte queste condizioni nei

miei esperimenti. Per ricercare come proceda lo sviluppo in assenza di O, ho messo ad incubare le uova sott' olio dopo aver rotto il guscio in corrispondenza della camera d'aria perchè anche in questa il liquido penetrasse scacciando l'O. Ho così visto dopo 24 ore l'aia opaca estendersi notevolmente e ricoprire buona parte del vitello (quasi la metà) mentre dell' aia trasparente poteva constatarsi un semplice accenno senza traccia di embrione.

A prescindere di ciò che v'ha di difettoso in questo sviluppo, noi non possiamo affermare che esso abbia luogo senza assorbimento di O libero, perchè è ammissibile l' ipotesi che l'embrione usufruisca dell'O disciolto nell'albume e nel vitello, non che di quello contenuto, tuttochè in tracce appena apprezzabili, nell'olio istesso.

Nè scevra di obiezioni è l' esperienza da me fatta tenendo le uova in azoto. Io le chiudevo in una scatola che facevo percorrere per 5 a 10 minuti da una corrente di azoto e nella quale versavo del pirogallato potassico per assorbire le tracce residuali di O. Ma è probabile che ne rimanesse sempre una piccola quantità mescolata all'azoto e disciolta nelle sostanze nutritive dell'uovo, e poichè ho visto in due casi mancare ogni accenno di sviluppo e 4 altre volte tale sviluppo essere assai variamente avanzato, non mi pare arrischiato supporre che nei due casi di mancato sviluppo l'ambiente in cui erano collocate le uova fosse veramente privo di O e negli altri casi ve ne fosse rimasta una piccola quantità, capace di alimentare l'attività vitale del germe nascente.

L' esistenza dunque di un vero stato anaerobico per le prime ore della vita embrionale non è rigorosamente dimostrata, e noi saremmo poco proclivi ad ammetterlo considerando che l' anaerobismo non si riscontra nel regno animale e si limita ad alcuni esseri microbici, la cui natura vegetale od animale è ancora dubbia. Comunque sia occorrerà tornare sull'argomento con altre e più rigorose esperienze concludendo per ora:

La necessità della respirazione che è di tutti gli animali a qualunque gradino della scala zoologica si appartengano, è anche di tutti i periodi evolutivi che un organismo superiore attraversa nella sua evoluzione, soltanto per le prime ore è forse ammissibile uno stato anaerobico.

Ciò che muta assai sensibilmente nella funzione respiratoria dell'embrione secondo il periodo di sviluppo che l'uovo ha raggiunto, è l' intensità del fenomeno e conseguentemente il consumo dell' O.

Le esperienze di Erman e di Schwann che avrebbero dovuto dimostrare l'anaerobismo dell'embrione, dimostrano invece che pei primi stadii evolutivi sono sufficienti quantità di O quasi inapprezzabili. La possibilità dello sviluppo dell'uovo malgrado l'invernicia-mento quasi completo della superficie del guscio, è un altro argomento in favore di questa tesi.

Io ho sperimentato lo sviluppo delle uova sotto acqua e la resistenza degli embrioni già pulsanti in questo ambiente.

Però alla scarsità della quota di O. disciolta nell'acqua che ordinariamente corrisponde per volume ai 9|1000 dell'ambiento liquido, si complicano in queste condizioni altre influenze che potrebbero nuocere per sè stesse. Voglio dire della densità del mezzo, delle sue qualità solventi rispetto ai sali e alle albumine dell' uovo, dell'ostacolo che certamente oppone all' evaporazione dell' acqua contenuta nell' uovo e del possibile inquinamento dell' albume e del vitello per sviluppo di germi. Quest' ultima circostanza è sopratutto facile ad avverarsi quando il soggiorno delle uova in acqua si prolunghi per un' intera giornata.

Ciò non ostante ebbi qualche risultato positivo.

Infatti mettendo ad incubare delle uova sott'acqua, dopo rottone il guscio in corrispondenza della camera d' aria di guisa che il contenuto dell' uovo non fosse diviso dall acqua circostante che mercè le membrane testacee, ho visto in qualche uovo lo sviluppo procedere fino alla 24ª ora così come nelle uova tenute ad incubare nell' ambiente atmosferico.

Quanto agli embrioni provvisti già di un cuore e pulsanti, venendo immersi in una vasca d'acqua tenuta a 38° proseguono a pulsare per un tempo (da 1 ora a 4) tanto più lungo quanto meno progredito è il loro grado di sviluppo. Le pulsazioni al principio sono regolari, poi si vanno rendendo sempre più rare e lente.

Dopo il 6° giorno essendo sviluppata l' allantoide la dimora in acqua non è più tollerata dall' embrione di pollo che per brevissimo tempo.

Meglio però che con ambienti liquidi, è a consigliarsi di eseguire queste esperienze con ambienti gassosi poveri di O.

Io ho perciò collocato delle uova in una scatola chiusa fatta percorrere per alcuni minuti da una corrente di azoto e nella quale l' O era così scarso che riusciva impossibile la combustione e un pulcino, già dischiuso, messovi dentro, moriva immediatamente. In questo stesso ambiente vidi le uova svilupparsi regolarmente fino alla 48ª ora e gli embrioni di 3 giorni pulsare per 4 a 5 ore di seguito. Gli embrioni di età maggiore risultavano meno resistenti e dopo il 6° giorno morivano rapidamente come nell'età adulta.

È dunque lecito distinguere nell' embrione di pollo: 1° un periodo di respirazione compiuta dall' aia vascolosa durante il quale il consumo dell'O è come negli animali acquatici, negli anfibii ed in alcuni insetti assai scarso e tanto più debole quanto meno progredito è lo sviluppo embrionale; 2° un periodo di respirazione allantoidea durante il quale i bisogni respiratorii raggiungono presso a poco l' intensità che è loro propria dopo la nascita nell' uccello e in tutti i vertebrati superiori.

*
* *

È egli necessario che l'embrione attinga continuamente nuovo O nell' ambiente o può provvedersene ad intervalli ?

Per rispondere a questo quesito ho sperimentato come tollerino gli embrioni di pollo un soggiorno transitorio in un' ambiente di azoto e l' immersione sotto olio.

Solevo immergere le uova in olio dopo di aver rotto il guscio in corrispondenza della camera d' aria, cosicchè tutta la superficie dell'albume era attraverso degli involucri investita dal liquido e non rimaneva O incluso nella camera d' aria.

Operavo queste esperienze sempre contemporaneamente su due uova. Dopo un tempo più o meno lungo di attesa le toglievo dalla vaschetta piena d'olio d'uliva tenuta a 38°, aprivo uno delle uova per constatare la persistenza dei battiti cardiaci o la loro sospensione e l'altro uovo lo detergevo dall'olio di cui era bagnato e lo riponevo in stufa per accertarmi se l'embrione contenutovi potesse riprender vita e continuare nel suo sviluppo.

Altre volte mettevo allo scoperto l' embrione nell' uovo e poi immersolo nell'olio assistevo al progressivo rallentamento dei battiti cardiaci e al momento della loro sospensione.

Immergendo le uova sotto olio si impedisce all'embriono ogni assorbimento di O dall' ambiente esterno, lasciandogli soltanto la possibilità di usufruire dell'O circolante nel sangue e di quello disciolto nell' albume e nel vitello.

La persistenza dei battiti cardiaci e della circolazione sanguigna ci servì per segnalare la persistenza della vita.

Ho così potuto constatare i seguenti fatti:

Gli embrioni di 3 giorni cessano di pulsare dopo un'ora di soggiorno in olio. Rimessi all'aria riprendono transitoriamente le pulsazioni e le riprendono definitivamente e durevolmente soltanto quando l' immersione in olio non si è prolungata oltre una mezz' ora.

Gli embrioni di 4 giorni serbano un contegno quasi uguale.

Gli embrioni di 5 a 6 giorni continuano a pulsare nell'olio per circa un'ora, ma dopo trenta minuti d'immersione sono già resi inetti alla vita e rimessi all'aria tuttochè ancora pulsanti non tardano a morire.

Dopo il 7° giorno gli embrioni di pollo immersi nell'olio non pulsano che per dieci minuti di tempo.

Le stesse esperienze sono state ripetute collocando le uova in una scatola che si faceva percorrere da 20 litri di azoto e nella quale si versava del pirogallato potassico per togliere le tracce residuali di ossigeno. In questo ambiente gli embrioni resistono assai più lungamente e per la natura gazzosa del mezzo che è più confacente e perchè vi rimangono forse delle tracce di O.

Vidi embrioni di 3 giorni continuare a pulsare per più di due ore e rimessi all'aria ritornare normalmente alla vita progredendo nello sviluppo.

Non è facile ricavare da queste esperienze delle conchiusioni ben determinate.

Può ammettersi infatti che l'embrione pulsi fin quando la piccolissima quantità di O contenuta nel sangue circolante e disciolta dei mezzi nutritivi dell'uovo non sia del tutto consumata o che le pulsazioni persistano in assenza di O. Comunque sia, più che tenersi conto della persistenza delle pulsazioni, deve tenersi conto della persistente vitalità. E poichè dopo essere stati immersi per un certo tempo nell'olio o chiusi in un ambiente di azoto gli embrioni continuano a vivere, ne conchiuderemo:

Che pei primi giorni d' incubazione è possibile interrompere total-

mente l'introito dell'O proveniente dall' aria senza che la vita degli embrioni ne sia definitivamente spenta.

*
* *

Dirò ora del meccanismo con cui si compie la respirazione dell' embrione.

Prima dello stabilirsi della circolazione sanguigna e dello inizio delle pulsazioni cardiache, l'O della respirazione viene fissato direttamente dai tessuti come ne viene direttamente eliminato l' acido carbonico, senza intermedio di un liquido circolante.

La funzione respiratoria è dunque supremamente semplificata in questo periodo embrionale, ridotta al fenomeno chimico senza complicazione del meccanismo esecutivo.

Dopo che il cuore ha cominciato a pulsare e la canalizzazione delle isole sanguigne e la comunicazione tra le diverse cavità vascolari si sono stabilite, è il liquido circolante che reca O ai tessuti, e che va ad attingerne nell' aia vascolosa.

Quest'ultima rappresenta l'organo respiratorio, in quanto che la sua vascolarizzazione e l'estensione della sua superficie fanno sì che il sangue che lo attraversa si trovi in contatto con l' ambiente e ne attinga O a dovizia. È però probabile che per la tenuità del volume dell'embrione e per la delicata permeabilità dei suoi tessuti, possa l' O oltre che dagli annessi, venire anche assorbito dalla superficie del corpo dell' embrione istesso.

Quanto al liquido circolante l'O vi si può disciogliere o combinare chimicamente coll'emoglobina. Certo v'è un breve periodo evolutivo durante il quale mancando l' emoglobina fissatrice l' O non penetrerà che in istato di semplice soluzione.

Apparsa però l'emoglobina, noi non sappiamo se diventi subito mezzo esclusivo d'importazione di O o se possa ancora pei processi respiratorii dei tessuti riuscire sufficiente la quota di O disciolta nel sangue.

Considerata la tenuità del consumo di O durante la respirazione vitellina, ciò era probabile ed ho cercato di assicurarmene in modo assai semplice sperimentando cioè sugli embrioni di pollo l'influenza dell'avvelenamento di OC.

Stando l' azione specifica di questo gas che produce asfissia combinandosi con l'emoglobina in un modo stabile ed impedendole

di fissare l'ossigeno per la respirazione, l'OC può riguardarsi come un reagente rivelatore del meccanismo respiratorio emoglobinico.

Sempre che l'organismo può provvedere all' introito dell'O in altro modo l' OC riesce assolutamente innocuo come lo è per gli animali a sangue bianco.

È inoltre un veleno respiratorio che agisce anche in piccole dosi ed in presenza di molto O. La diluizione di una parte di OC su trecento di aria uccide un cane in cinquanta minuti. Perchè un passaro muoia dopo un ora, la dose tossica è di uno su quattrocento. (Gréhant poisons de l'air, 1890).

Ho proceduto intanto nelle mie ricerche con OC nel modo seguente :

Ho adoperato una scatola quadrata di stagno munita in due pareti opposte di due fori, dei quali uno sito in alto serve per l'introduzione dell'OC l' altro in basso per la sua eliminazione.

La parete superiore della scatola è formata da una lastra di vetro che, dopo l'introduzione delle uova, viene lutata accuratamente con paraffina sul contorno di stagno.

Il guscio delle uova è rotto al polo ottuso in corrispondenza della camera d'aria, per dare più facile accesso all'ossido di carbonio e rendere più facili gli scambii gassosi (per lunga esperienza ho constatato che questa condizione non nuoce allo sviluppo delle uova).

Nella scatola è poi messa una vaschetta piena d'acqua perchè l'ambiente sia umido e poi viene introdotta la miscela gassosa.

La preparazione di un miscuglio titolato di OC ed aria fu ottenuta in modo un pò grossolano ma perfettamente idoneo allo scopo.

Si riempiono due gassometri uno d'aria, l'altro di OC (1) e si mettono in comunicazione con una boccia di Woolff a tre imboccature riempita a metà di acido solforico. I due tubi afferenti pescano nel liquido per modo che i gas vi gorgogliano passando, dal foro mediano penetra un tubo di vetro che rimane libero al disopra della superficie del liquido e che mette in comunicazione lo spazio in cui si raccolgano i gas colla scatola delle uova.

Regolando i rubinetti del gassometro e premendo con pinze

---

(1) L'OC fu preparato con ferro cianuro potassico e acido solforico e lavato in soluzione alcalina prima di raccogliersi in un gassometro.

apposite i tubi afferenti, si riesce con qualche studio a limitare il numero delle bolle d'aria che gorgogliano nel liquido fino a ridurle a 3 o 4 per minuto. È facile intendere che contando le bolle d'aria e quelle di OC si può regolarne il passaggio in modo che in un unità di tempo di ciascuno dei gas passi un numero determinato di bolle il cui rapporto reciproco ci farà valutare la composizione della miscela.

Ho usato generalmente una miscela di OC ed aria nel rapporto di uno a quattro, più raramente nel rapporto di uno a due a correnti continue, oppure rinnovando il contenuto gassoso della scatola ogni mezz' ora.

Per l'eliminazione dei gas veniva innestato al forame inferiore della scatola un lungo tubo che sbucava fuori della finestra.

Ciascuna esperienza volse contemporaneamente sopra uova di diversa età e si prolungò da due a tre ore, fino a 48 ore.

Lo stato di combinazione dell' emoglobina con l' OC veniva controllato collo spettroscopio constatandosi la stabilità delle due linee di assorbimento, che non scompaiono nè quando il sangue è trattato con una sostanza riducente, nè quando viene sottratto assolutamente al contatto dell' aria.

Esperienze coll'OC.

N.° d'ordine	Età dell'uovo	Proporzione della miscela gassosa	Durata d'azione	Esito	Reperto spettroscopico	
1	giorni 15	1 di OC su 10 aria	2 ore 1|2	morto	le 2 linee di assorb. persistono malgrado aggiunta di solfuro d'amm.	1° Esperimento
2	„ 13	„	„	„	„	
3	„ 7	„	„	vivo — presenta il sangue rosso ciliegia	„	
4	„ 4	„	„	vivo—pulsa normalmente, il sangue è rosso ciliegia	„	
5	„ 3	„	„	„	„	
6	„ 3	„	„	presenta qualche pò di rallentamento nelle pulsazioni,ma vive perfettamente bene	„	
7	„ 15	1 di OC su 4 aria	3 ore	morto, sangue rosso intenso	Emoglobina ossicarbonica	2° Esperimento
8	„ 8	„	„	semivivo, ma pulsante	„	
9	„ 7	„	„	vivo pulsa bene, sangue rosso ciliegia	„	
10	„ 4	„	„	vivo pulsa bene, sangue rosso ciliegia	„	
11	„ 3	„	„	vivo pulsa, sangue rosso	„	
12	„ 9	OC e aria p. eguali	3 ore	morto	Emoglobina ossicarbonica	3° Esperimento
13	„ 16	„	„	morto	„	
3	g. S. subì (Esp. 1)	„	„	morto	„	
4	giorni 5 (Esp. 1)	„	„	vivo	„	
5	giorni 4 (Esp. 1)	„	„	vivo	„	
6	giorni 4 (Esp. 1)	„	„	vivo	„	
14	„ 10	OC puro	5 minuti	pulsa debolmente ed è tutto rosso.	„	4° Esperim.
15	„ 3	„	„	vivo pulsa normalmente	„	
16	„ 3	„	„	„	„	
17	„ 7	„	„	„	„	

N.° d'ordine	Età dell'uovo	Proporzione della miscela gassosa	Durata d'azione	Esito	Reperto Spettroscopico	
15	g. 3 subito dopo Es. 4°	OC e aria 1 : 4	3 ore	vivo		5° Esperimento
16	giorni 3	„	„			
5	g.5.È servito per Es. 1° e 3°	„	„	le 2 esp. subite lo hanno alterato nonchè lo stare col guscio aperto pur tuttavia vive		
17	g. 3 subito dopo Es. 4°	„	„	pulsazioni card. rare, all'aria si ristabilisce la frequ. norm.		
18	giorni 7	„	„	pulsa come il precedente. Nell' osservarlo vien leso l'allantoide, ne segue la morte		
19	„ 9	„	„	morto		
20	„ 11	OC e aria 1 — 4	4 ore	morto	Raccolgo dai 3 emb. di 4 g. il sangue per avere uno strato abbastanza spesso. Allo spettroscopio il sangue non perde le 2 linee di ass. neppure dopo 2 g. essendo sottratto al contatto dell' aria.	6° Esperimento
21	„ 8	„	„	morto		
22	„ 4	„	„	vivo		
22(1)	„ 4	„	„	„		
22(2)	„ 4	„	„	„		
23	„ 3	OC e aria p. eguali	24 ore	vivo e cresciuto in volume pulsa bene ma è molto anemico e dopo qualche ora muore		7° Esp.
24	„ 3	OC e aria 1 — 4	48 ore	l' emb. è scoperto. Lo si vede pulsare fin dopo 30 ore, dopo 48 pare morto di recente.		8° Esp.
25	„ 3	„	„			
26	„ 4	OC puro	4 ore	non pulsa ma rimesso all'aria il cuore presenta qualche contrazione		9° Esp.
27	„ 4	„	4 ore	non pulsa ma rimesso all' aria ripiglia per qualche ora le sue pulsazioni		

Dalle fatte esperienze, registrate nella tavola qui annessa, risulta che gli embrioni di pollo fino all' età di 7 giorni tollerano senza danno un soggiorno di 2 a 3 ore in un miscuglio di OC ed aria a parti uguali o anche più ricco in OC. Nel 7° giorno questa resistenza si menoma e dall'8° in poi svanisce bruscamente.

Nell'esperienza 5ª gli embrioni 17 e 18 di 7 giorni dopo 3 ore di permanenza in una miscela di OC ed aria nella proporzione di 1 a 4 presentavano un certo rallentamento circolatorio, ma tosto si rimisero tornando allo stato normale.

Nell'esperienza 3ª invece l'embrione 3 di 8 g., che il dì prima era vissuto bene malgrado una dimora di due ore e mezzo in OC non tollerò 24 ore più tardi questo stesso trattamento.

Nell'esperienza 2ª i 2 embrioni 8 e 9, l'uno di 7 e l'altro di 8 g. non differendo che di un giorno, tennero contegno assai diverso, poichè l'embrione 9 di 7 giorni sopravvisse e l'altro di 8 giorni fu trovato morto.

La resistenza degli embrioni di 3 giorni è poi veramente notevole.

Avendo rotto in corrispondenza della camera d'aria il guscio di un uovo giunto al 3° giorno d' incubazione e messo allo scoperto l'embrione pulsante vigorosamente, lo chiusi nella scatola delle uova insieme ad un topolino.

Lutata accuratamente la lastra di chiusura, potevo osservare attraverso la stessa il topo e l'embrione pulsante.

Ho aperto allora il rubinetto del gassometro contenente OC ed ho lasciato che una forte corrente di OC giungesse nella scatola delle uova.

Il topo nella sua gabbia dette un balzo addietro, scosse più volte convulsivamente il corpo e dopo 80 soli secondi giacque immobile.

Interruppi allora la corrente di OC e vidi l' embrione pulsare normalmente per 5 ore durante le quali potetti osservarlo.

Il dì dopo trovai fetidissimo l' ambiente perchè il topo a 38 gradi si era rapidamente putrefatto, l' embrione non pulsava più ma parea morto di recente.

Evidentemente oltre la presenza dell' OC avea qui influito lo sviluppo di gas fetidi in un ambiente chiuso.

Volli sperimentare in condizioni migliori quanto tempo possa vivere un embrione di 3 giorni in un ambiente fatto di OC ed aria a parti uguali e se la vita reggesse anche nell' OC puro.

Nell'esperienza 7ª vidi un embrione di 3 giorni in un ambiente fatto da OC ed aria a parti uguali dopo 24 ore vivo, pulsante e cresciuto in volume; ma era molto anemico così che dopo qualche ora morì.

Nell'esperienza 8ª due embrioni della stessa età non cessarono di pulsare che dopo 48 ore di soggiorno in un ambiente di OC ed aria a parti uguali.

Sostituendo ad una miscela di OC ed aria un ambiente di OC puro, vidi nell' esperimento 9 in 2 embrioni di 4 giorni cessare le pulsazioni dopo un soggiorno di 4 ore.

Rimessi però all'aria uno di essi embrioni riprese le sue pulsazioni e visse qualche ora, l'altro presentò soltanto qualche contrazione del cuore.

È notevole che gli embrioni sopravissuti in un ambiente di OC come quelli morti, presentano il sangue intensamente rosso con le note spettroscopiche che lo caratterizzono.

Ho avuto qualche pena nel constatare le due linee di assorbimento del sangue degli embrioni inferiori a 6 giorni, perchè la quantità di sangue contenuta nel piccolo organismo è assai scarsa e perchè in questo tempo il sangue è assai più diluito e povero di contenuto corpuscolare. Mi fu perciò necessario osservarlo in uno strato assai spesso e per raccoglierne quantità sufficienti ho adibito parecchi embrioni per un' osservazione unica.

Quale interpetrazione va data a queste esperienze?

L' OC presenta per l'emoglobina un' affinità chimica più forte che non presenti l'O. Posto che nell' ambiente si contenga tanto OC da saturare l' affinità di tutta l' emoglobina contenuta nel sangue l'O che vi si trova combinato sarà tutto scacciato e sostituito volume per volume da OC.

Possono perciò anche piccole quantità di OC uccidere gli animali e questi morire asfittici iu un ambiente ricco di O. L'emoglobina ossicarbonica non cede ossigeno ai tessuti e non può più attingerne nell'ambiente, se pure riescono i tessuti a scinderla in emoglobina ed OC, perchè questo ultimo si elimini e subito non si ricombini occorre che l' ambiente non contenga neppure traccia del veleno.

Io ho sperimentato con miscugli che conteneano ossido di carbonio ed aria a parti uguali e nessuno dubiterà che in queste condizioni tutta l'emoglobina dell' organismo venga saturata da OC e tolta al suo ufficio respiratorio finchè l' organismo permane nello ambiente tossico.

Gli embrioni che soccombono e parimenti quelli che sopravvivono, presentano nel sangue le stesse proprietà spettroscopiche ed il colorito rosso ciliegia che rivela la presenza dell'OC.

Orbene perchè un organismo respirante non soggiaccia all'avvelenamento da OC o vi resista lungamente due condizioni possono darsi: o una sospensione dei processi respiratorii compatibile colla vita, oppure un'altro modo d'introdurre O.

Che gli embrioni che non muoiano in una miscela di OC ed aria continuino a respirare a spesa dell'O contenutovi, lo prova il fatto, che le pulsazioni cardiache dell'embrione cessano quando alla miscela di OC ed aria si sostituisca l'OC puro.

D'altra parte, come risulta dall'esperienza 7ª, un embrione in un'ambiente di OC ed aria a parti uguali vive per 24 ore e cresce di volume , certo nessuno penserà che possano sussistere senza il concorso dell'ossigeno processi nutritivi tanto vivaci da determinare un accrescimento di volume.

Vorrà dunque dire che esiste un altro modo per introdurre O. Esso potrà disciogliersi nel plasma sanguigno o venir fissato direttamente dall'embrione, reso a ciò adatto dalla tenuità del suo volume e dalla permeabilità dei suoi tessuti.

La 1ª ipotesi è più probabile che non sia quest'ultima, perchè al settimo giorno la resistenza all'avvelenamento è ancora notevole ed il volume assunto dall' embrione è già troppo grande per ammettere una respirazione diretta dei tessuti.

Comunque si effettui però questa respirazione , dirò vicariante, certo i processi ossidativi che si compiono nei tessuti debbono essere poco intensi perchè basti ad alimentarli per un tratto abbastanza lungo di tempo la piccola quota di ossigeno che può disciogliersi nel sangue.

All' 8° giorno d' incubazione avendo l' allantoide raggiunto un discreto sviluppo ed una grande vascolarità , l' OC diventa letale perchè venendo meno l' O che accede mercè l' emoglobina , non è

più sufficiente per i bisogni respiratorii l' O che si discioglie nel plasma sanguigno.

Prima di questo periodo la funzione dell'emoglobina, pure essendo necessaria, può non essere continua e sospendersi più o meno lungamente rimanendo affidata al plasma sanguigno l'ufficio di dissolvere l' O e di recarlo ai tessuti.

Si noti ora che nei gradini più bassi della serie animale la funzione respiratoria si compie senza intervento dell'emoglobina e che questa sostanza compare quando con la maggior perfezione dell'organismo e con la maggiore attività di processi vitali si accresce la vigoria dei processi ossidativi.

È perciò un mezzo di cui la natura si serve per soddisfare alla intensità dei bisogni respiratorii e del quale fa a meno negli animali debolmente respiranti.

Tra gli organismi a respirazione emoglobinica e quelli che ne sono privi, formano termine di passaggio gli organismi nei quali la respirazione emoglobinica esiste ma non è mezzo esclusivo d' importazione di O potendo almeno temporaneamente soddisfare ai bisogni respiratorii la quota di O disciolta nel sangue.

Così tra gli anfibii la rana resiste d' inverno 3 giorni in un ambiente di OC ed O a parti uguali, ambiente in cui un animale a sangue caldo morrebbe immediatamente per l'incapacità funzionale dell' emoglobina.

In conchiusione l' emoglobina segnala nella serie animale l' intensità dei processi ossidativi e riesce tanto meno necessaria quanto meno intensi sono questi processi.

Nell' evoluzione embrionale dell' uccello la funzione respiratoria si compie prima direttamente dai tessuti (come negli infusori e negli animali infimi): poi interviene un liquido circolante incolore (analogia cogli animali a sangue bianco), in un terzo stadio che è quello della respirazione vitellina l' emoglobina è presente e già utile alla respirazione, ma è possibile che se ne sospenda temporaneamente la funzione (animali a sangue freddo), finalmente con la respirazione allantoidea si accresce l' intensità respiratoria ed il meccanismo emoglobinico diventa indispensabile alla vita, perchè non può in altro modo, neppure temporaneamente, soddisfarsi ai bisogni respiratorii

dell' organismo (condizione questa comune a tutti gli animali a sangue caldo).

***

Un' altro quesito deve essere proposto riguardo alla respirazione :

Per la funzione respiratoria, come per ogni funzione, è a chiedere quali condizioni governino la sua intensità e se questa si esalti o si attenui proporzionatamente all'attività degli agenti esterni.

Il meccanismo respiratorio che presiede all'introduzione dell'O ed alla sua distribuzione nei tessuti, la composizione del mezzo respirabile da cui gli organi respiratorii attingono l' O , sono tutte condizioni necessarie all'attuazione del fenomeno, così che l'assenza d'una d'essi basta a sospenderlo o ad ostacolarlo, ma è l'intensità del fenomeno proporzionato all'attività dei meccanismi respiratorii e alla ricchezza dell' O contenuto nell'ambiente ?

Se la rapidità del circolo fa giungere a contatto dell'elemento cellulare in un' unità di tempo una maggiore quantità di O, se per la composizione del mezzo respirabile ne accede nei polmoni una quota superiore a quella ordinaria , la cellula aumenterà perciò i suoi processi ossidativi , e consumerà quantità maggiori di O che prima non facesse ?

Il Limousin ha dimostrato che inalando O o facendolo inalare agli animali, se ne assorbe quantità maggiore del normale e si elimina CO_2 in proporzione doppia che non si faccia nell' ambiente atmosferico. Dopo sospesa l' inalazione l'abbondante emissione di CO_2 continuerebbe per circa mezz'ora.

Robert Pott (v. Preyer. Phys. de l'embryon, 129) ha similmente constatato una maggiore eliminazione di CO_2 da parte delle uova fecondate tenute in un' atmosfera di ossigeno puro.

Ammesso che l'eliminazione del CO_2 sia un indice dell'attività dei processi ossidativi intracellulari, ciò proverebbe che sugli organismi embrionali e sugli adulti influisce la quantità considerevole di O contenuta nell'ambiente determinando un aumento dei processi ossidativi.

Io ho voluto studiare il modo di comportarsi degli embrioni di pollo in un ambiente di O e di ozono per ricercare se in coin-

cidenza degli scambii respiratorii attivati, si determinino nell'organismo gli effetti d'un' aumentata ossidazione.

Partendo dalla nozione oramai generalmente accetta, che l'attività dei processi respiratorii valga a consumare il grasso così come la scarsità dell'accesso dell'O ne determina l' accumulo, ho ricercato se negli embrioni tenuti in una corrente di ossigeno puro diminuisca o scompaia il grasso depositato nei tessuti.

Occorre quì dire che negli embrioni che hanno oltrepassato il 7° giorno d'incubazione ho avuto occasione di constatare una condizione assai singolare, cioè a dire una generale infiltrazione di grasso in tutti gli organi ed in tutti i tessuti.

Il fegato, il cuore, le capsule soprarenali, i reni, la milza, le cellule connettivali e talvolta anche i muscoli volontarii, sono fittamente e uniformemente infiltrati di grasso.

È tanto cospicua l' infiltrazione che fissando gli organi nel liquido di Flemming essi appaiono del tutto anneriti e dissociandoli in glicerina, sopratutto nel fegato e nelle capsule soprarenali non v' à cellula che non contenga un numero più o meno grande di piccole goccioline e talvolta un unica goccia più grossa.

Quest'infiltrazione muta però con l'età ed è meno cospicua nel 7° ed 8° giorno che nei giorni successivi, cosichè in questo periodo può assistersi alla comparsa del grasso ed al graduale suo accumularsi.

Io ho tenuto in ossigeno puro embrioni di età diversa, prolungandone variamente il soggiorno e paragonandone ciascuna volta lo stato d'infiltrazione grassa con quella di embrioni coetanei tenuti in eguali condizioni di temperatura e di umidità.

Le uova furono collocate nella solita scatola usata già per le esperienze con OC. l'ambiente fu reso umido da una vaschetta d'acqua, le uova per maggior cura discontinuate nel guscio in corrispondenza della camera d'aria, per render facili gli scambii gassosi.

L' O partiva da un gassometro passando per una boccia di Wolff riempita per metà di acqua alcalina e di qui mercè un tubo di gomma veniva portato nella scatola al forame superiore della stessa.

Per alcune uova riempiuta la scatola di O puro, si curò di

rinnovarlo ogni ora o due, lasciandovelo stazionare 12 ore quando l'osservazione si prolungava di notte. Per altri, regolando opportunamente i rubinetti del gassometro e apponendo sul tubo afferente una pinza a pressione, si regolò una corrente continua, ad alimentare la quale occorsero ogni 12 ore 25 litri di gas.

La dimora nell'ambiente di O fu prolungata per alcune uova fino a 24 ore per altre fino a 4 giorni ed ogni volta furono fissati nel liquido di Flemming i diversi organi dell'embrione isolatamente e ne fu studiato il contenuto in grasso sia con preparati per dissociazione, sia con tagli a mano.

Come ho già detto non mancò mai il controllo di embrioni svoltisi nell'ambiente atmosferico, in uguali condizioni di temperatura e d'umidità.

Esperienze coll'O

N.° d'ordine	Età dell' embrione	Durata dell'esperienz. e sue condizioni	Esito	Controllo
1	12 g.	Corrente di O durata 24 ore temp. 38°.	Fegato, cuore, reni, infiltrati di grasso. Non lo sono i muscoli del petto.	Embr. 13 g. tenuto in O per lo stesso tempo. Organi egualm. infiltrati.
2	11 g.	idem	Fegato, muscoli, capsule e cuore infiltrati. Rene poco.	Embr. 12 g. fegato, cuore, capsule e reni infil. molto.
3	9 g.	idem	Fegato, cuore, capsule poco infiltrati.	Embr. 10 g. Tutti gli organi fortem. infiltrati.
4	8 g.	idem	Tutti gli organi meno infiltrati che nei casi precedenti. Nel rene manca il grasso	Embr. 9 g. Gli organi meno infiltrati che nei casi precedenti.
5	13 g.	Ambiente di O rinnovato di gior. ogni 2 ore. Il soggiorno dura 4 giorni.	Tutti gli organi e specie fegato e capsule sono infiltrati di grasso.	Embrione 1 giorno. Gli organi disfatti.
6	9 g.	idem	L' infiltrazione è generale e cospicua.	Embr. 13 g. Gli organi sono tutti infiltrati.
7	6 g.	idem	L' infilt. è cospicua benchè l'embrione fosse messo in O in età in cui il grasso è poco abbondante o manca	Embr. 10 g. Infiltraz. cospicua.
8	7 g.	idem	L' infiltrazione è notevole pari a quella dell'embrione di controllo.	Embr. 11 g. Mediocre infiltr. in tutti gli organi.
9	5 g.	idem	L' infiltrazione nel fegato e nelle capsule è notev. non così nei reni e nel cuore	Embr. 9 g. Infiltr. del cuore più cospicua che nell'embrione tenuto in O. Pel resto tutto è uguale.
10	18 g.	Per 24 ore si teng. le uova in corr. cont. poi per 2. g. si teng. in un amb. di O rinnovato a brevi intervalli.	L' embr. respira e ha tentato di rompere il guscio. L' infiltr. è generale e cospicua meno nel cuore.	Embr. 21 giorni dischiuso. L' infiltr. gener. e cospicua.
11	17 g.	idem	L' embrione ha respirato. Infiltrazione generale e cospicua.	

Con questi esperimenti si constata che gli embrioni di pollo tollerano perfettamente un soggiorno anche di 4 giorni in un ambiente di ossigeno puro. Considerando che nei casi da me osservati non v'è stato nè nello sviluppo nè nello accrescimento una deviazione dal tipo normale, è a prevedersi che la dimora in ossigeno possa prolungarsi indefinitamente.

Lo arrossimento dei tessuti embrionali e delle acque dell'ammios per diffusione di emoglobina (constatato da Baudrimont Saint-Anges e da Robert Pott) non fu da me osservato.

Gli embrioni tenuti 4 giorni in O puro non differiscono in nulla dai loro coetanei tenuti nell' ambiente atmosferico.

Il grasso a prescindere da qualche oscillazione individuale, non scompare nè diminuisce nei tessuti allorchè l' embrione ha vissuto 4 giorni in O, neppure quando è messo in O prima dello stabilirsi dell' infiltrazione grassa.

Dunque la respirazione in un ambiente di ossigeno puro non determina nelle cellule un' attività di processi ossidativi tale che aumenti il consumo del grasso in esse contenuto.

*
* *

Considerando che l'ozono ha facoltà ossidanti assai più energiche che l'O e che può essere assorbito dall'organismo come tale, ho ripetuto per l'ozono le istesse esperienze ricercando sempre se possa per una tale modificazione del mezzo respirabile accrescersi notevolmente l'intensità dei processi ossidativi.

Considerata poi la facilità con cui l'ozono si scompone in presenza delle sostanze organiche, per tenere gli embrioni continuamente in contatto del gas, occorrea fare attraversare la scatola delle uova da una corrente continua di ozono.

Ho preparato l'ozono sottoponendo l'O alla scarica di un rocchetto di Rumkoff in un tubo di Bertholet.

Una corrente di ossigeno desidratata in una boccia di Wolff con acido solforico, percorrea il tubo di Bertholet e poi a traverso un tubo di vetro opportunamente ricurvo giungeva al forame superiore della scatola delle uova. Al foro di uscita della stessa veniva innestato un altro cannello di vetro e fissato con un manicotto di gesso di presa. Apponendo all'estremità di questo cannello una carta ozo-

noscopica, questa si colorava in azzurro rivelando così la presenza dell'ozono benchè già a ciò bastasse il suo odore tanto caratteristico.

Con non poca difficoltà sono riuscita a tenere le uova in una corrente di ozono financo 15 ore di seguito, non potendo però sorvegliare l' andamento dell' apparecchio anche di notte, m'era forza interrompere il passaggio dell'ozono e lasciare le uova per 10 ore circa in un ambiente di ossigeno puro.

Esperienze coll' Ozono

N.° d' ordine	Età dell' embrione	Durata e condizioni della esperienza	Esito	Controllo
1	12 g.	È tenuto 15 ore in ozono e dopo interruzione della notte durante la quale rimane in 0 vien rimesso per 10 ore in oz.	Vivo. Infiltrazione grassa cospicua e generale.	Embrione di 13 giorni. Infiltrazione grassa notevole.
2	12 g.	idem	idem	
3	9 g.	idem	Vivo. Infilt. grassa ab bastanza notevole e diffusa specie nei reni.	Embr. di 10 gior. Infiltrazione grassa notevole.
4	10 g.	Con interruz. delle notti durante le quali è tenuto in 0 rimane 4 gior. in oz.	Vivo. Infiltrazione co spicua.	
5	17 g.	Rimane 6 gior. in corrente di oz. con interr. delle notti durante le quali sta in ossigeno.	Al 23° g. schiude il pulcino e muore dopo una gior. di permanenza in oz. Vi è adipe sotto cutaneo. Infiltraz. gen.	Embr. 22 giorni. Infiltrazione cospicua generale.
6	17 g.	idem	Trovato morto. Infiltr. di grasso cospicua.	Embr. 21 giorni. Infilt. gen. meno che nel cuore.
7	8 g.	idem	Morto. Infiltraz. gener. meno che nel cuore.	Embr. 14 g. Infilt. gener. notevole.
8	12 g.	5 ore in Oz. 10 in 0 12 » » » 12 » »	Vivo, nel fegato non c'è vera infiltraz. ma un aspetto torbido.	

Le uova di controllo, per escludere ogni influenza dell' ozono diffondentesi nell' aria eran tenute in un altra stufa incubatrice in eguali condizioni di temperatura e di umidità.

Da questa esperienza si conchiude: Che un pulcino può tollerare reiterati soggiorni in una corrente di ozono senza morirne in un buon numero di casi.

Che salvo oscillazioni individuali non pare che per la respirazione in un ambiente di ozono diminuisca nei tessuti l' infiltrazione del grasso.

*
* *

Riassumo:

Ho già dichiarato all'inizio del presente lavoro e lo ripeto nel chiuderlo: le mie ricerche sono essenzialmente incomplete e preliminari. Valgono però a rinforzare in me il convincimento di una verità che mi propongo di dimostrare ulteriormente in modo più ampio e completo.

Che cioè agli stadii evolutivi dell' embrione, corrispondono qualità fisiologiche assai diverse.

Che come esistono analogie morfologiche tra l' embrione degli organismi superiori e certi organismi inferiori, così esistono analogie, ed assai più strette e reali, tra gli stati funzionali transitorii dell'embrione ed il contegno funzionale degli animali inferiori.

BIBLIOGRAFIA

1. *Baudrimont* et *Martin Saint-Anges* — Recherches sur les phenomènes chimiques de l' évolution embryonaire des oiseaux et dés batraciens — Annales de chimie et de phisique, 3eme Serie XXI, 195-295. Paris 1849.

(Dimostra come le uova d' uccello e dei batraci producono CO_2 e constata, che le uova di rana si distruggono se tenute in acqua priva d' aria).

2. *Prevost* et *Dumas* — Les changements de poids que les oeufs éprouvent pendant l' incubation. Ann. des sciences nat. 4 V. 47-56 1825. (Dimostrano in modo approssimativo e con metodi poco rigorosi che le uova non fecondate assorbono meno O ed eliminano minor quantità di CO^2 che le uova fecondate).

3. *Rob. Pott.* e *W. Preyer* — Ueber den Gaswechsel und die chemischen Veränderungen des Hühnereies während der Bebrütung. Pflüger's. Archiv. Bd ZXVII S. 320-371, 1 Taf. 1882.

4. *Camille Dareste* — Anomalies des annexes de l' embryon. Arch. de zool. exp. par Lacaze-Duthiers. Paris 1876, (constata la morte per asfissia negli embrioni il cui allantoide è leso).

5. *Dareste* — Développement des végetation cryptogamiques dans l' oeuf de la poule pendant l' incubation. Gazette med. de Paris. 15 oct. 1881 Paris. P. 592-593 , (necessità del rinnovamento dell' aria circostante all' embrione).

6. *Erman* — Gewichts-abnahme befruchteter und unbefruchteter Eier. Oken's Isis, 1 Bd. S 122, 1818 Iena, (ammetterebbe l' inutilità dell' O per lo sviluppo dell' embrione).

7. *Viborg* — Bericht an die königl. Dänische Gesellschaft über die Versuche, welche er mit Ausbrut von Eiern in Gasarten die zum Athemholen untauglich sind, angestellt hat. In des Verf. Sammlung von Abhandlungen für Thierärtzte und Okonomen , 4 Bd, S. 445, (ammette la necessità dell' O per lo sviluppo delle uova di pollo).

8. *Th. Schwann* — De necessitate aéris atmosphaerici ad evolutionem pulli in ovo incubito. Berlin Inaug. diss. 1834, 32 Stn. Müllers. Archiv. 1835, 121-127. (Dimostra come l' evoluzione non possa aver luogo in assenza di O. Le uova messe ad incubare nell' idrogeno si sviluppano fino alla 15ª ora).

9. *Iohn Marshall* — Beweis das für die Embryobildung im Hühnerei Luftzutritt nothwendig ist. London Medical. Gazette for nov. 1840. N. S. 1. B. 242-250 London. (Vide svilupparsi delle uova ricoperte da parecchi strati di carta e di albume perchè la formazione di piccole screpolature permette l' introito dell' O. Non si sviluppano invece le uova avvolte in una parete intestinale e tenute così sotto olio).

10. *Ioseph Towne*—Beobachtungen über das bebrütete Ei Schmidts Iahrb. d. ges Medicin, 3 Suppl. Bd. Leipzig 1842. (Dimostra a torto che l' embrione può svilupparsi senza O. Queste esperienze valgono invece a provare come possa limitarsi di molto l' introito dell' O senza ostacolare lo sviluppo).

11. *Dareste* — Sur l' influence qu' éxerce sur le développement du poulet l' application partielle du vernis sur la coquille de l' oeuf. Annales des sciences nat. 4eme S. Zool. IV , 119-128, 1855 ; anche Comptes Rendus de l' Ac. d. sc. Paris 1855, 963.